

QProbe を用いた SNP タイピング

日鉄住金環境株式会社

【原理】

QP 法は、ある種の蛍光色素にグアニン塩基が近づくと、発する蛍光が減少する「蛍光消光現象」を利用して、目的の遺伝子を検出する手法です。

蛍光標識したシトシンを末端にもち、目的遺伝子と相補的な配列に設計したプローブ(QProbe)は、目的遺伝子とハイブリッドを形成するとグアニンの影響を受けて蛍光が減少します。(図1)

SNP タイピングに用いる QProbe は、SNP 部位が中央付近にあり、片方の遺伝子型と完全に相補的な配列にしています(図2)。

ゲノム DNA を抽出・精製し、目的 SNP 部位を含む領域を PCR などで増幅後に温度を下げると、QProbe が SNP 部位とハイブリッドを形成し、相補鎖のグアニンの作用で蛍光が減少します。

次に、温度を徐々に上げると、QProbe が解離して蛍光が増加します。QProbe と相補鎖の塩基配列にミスマッチがあると、ハイブリッド形成力が弱いために低い温度で解離し、蛍光の増加も低い温度で起こります。このように蛍光が増加する温度から、一塩基の違いを判別することができます(図3)。

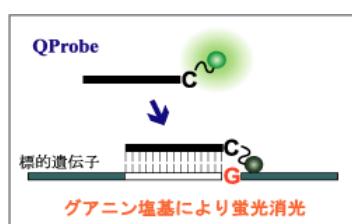


図1 QP法の遺伝子検出原理

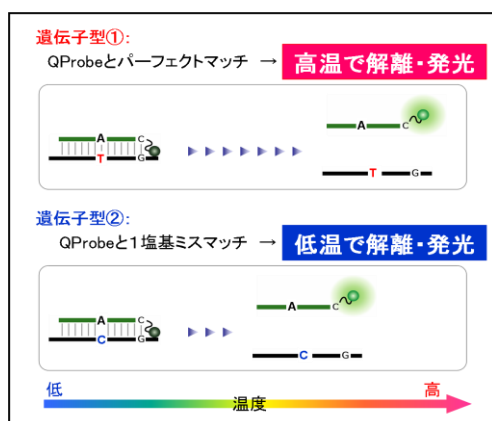


図2 QP法によるSNPタイピング原理

QProbe が目的遺伝子から離れて蛍光が増加する温度の違いから遺伝子型を判別します。

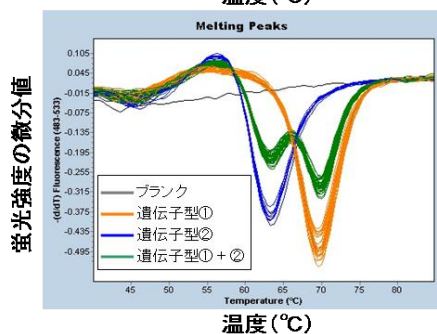
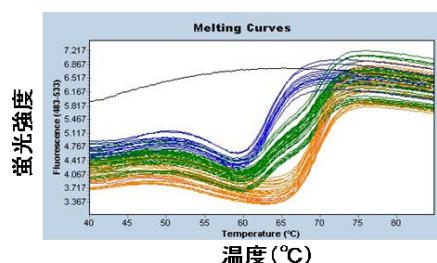


図3 QP法によるSNPタイピング例

上：解離曲線（蛍光値の変化）

下：解離ピーク（解離曲線データの微分値）

解離ピークの頂点の温度が、QProbe が目的遺伝子から離れる温度を示しています。

【QProbe の蛍光波長】

QProbe 種別	励起波長(nm) / 蛍光波長(nm)
QProbe-G	500 / 510
QProbe-Y	520 / 555
QProbe-R	550 / 580

【QProbe の保存】

- ・遮光に留意して、 -20°C で保存してください。
- ・凍結融解の繰り返しを避けるために、少量ずつ分注してご使用ください。

【必要な試薬、器具、機器】

1. 試薬

- ・ DNA ポリメラーゼ (5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性のないもの)、PCR バッファー、dNTP (dUTP を含む)
推奨: LightCycler480 ジェノタイピングマスター (ロシュ ダイアグノスティックス社製)
- ・ ウラシル N グリコシラーゼ (UNG)
※PCR 増幅産物のコンタミネーション防止のために使用されることをお勧めします。
推奨: ウラシル-DNA グリコシラーゼ, 熱感受性 (ロシュ ダイアグノスティックス社製)
- ・ 標的遺伝子増幅用プライマー
- ・ 滅菌水

2. 器具

- ・ 各マイクロピペット
- ・ マイクロピペット用チップ (疎水性フィルター付)

3. 機器

- ・ リアルタイム PCR 装置 推奨: LightCycler 480 (ロシュ ダイアグノスティックス社製)
- ・ PCR 反応プレートまたはチューブ (使用する装置の純正品)

【プロトコール】

操作上の留意点

- ・ 凍結保存していた試薬を室温で解凍後に瞬時遠心し、直ちに氷上に置いてください。
- ・ QProbe は、作業中もできる限り遮光に留意してください。
- ・ 万一、プローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出ができません。汗や唾液からヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、作業には細心の注意を払って下さい。
- ・ PCR 反応は非常に感度の高い反応です。PCR 増幅産物のコンタミネーションには特に注意し、十分な防止策を施してください。本製品では、反応終了後の増幅産物を電気泳動などで解析する必要はありませんので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

1. 検体の調製

- (1) 試料 (血液・口腔粘膜細胞等) よりゲノム DNA を抽出・精製します。
- (2) サンプルの DNA 濃度は 10~20 ng/μl を目安としてください。

2. リアルタイム PCR 装置の設定

装置の取り扱いの詳細については、各機種の取扱説明書をご参照ください。

＜反応温度条件例 (LightCycler 480 使用時)＞

標的遺伝子や機種によって、温度や時間の最適条件は変動します。

	Temperature	Time		Cycles
Hot start	95°C	10 min		1
PCR	95°C	10 sec		
	60°C	20 sec	蛍光測定※1	40~50
	72°C	10 sec		
Melting Curve	95°C	10 sec		
	40°C	20 sec		
	↓	0.2°C/sec 程度で昇温	蛍光測定	1
	95°C	1 sec		

※1 ここで蛍光測定を行うと、QProbe の T_m がアニーリング温度より高い場合は、PCR 産物の増幅過程をモニタリングできます (産物が増えると、蛍光が消光します)。ただし、QProbe とミスマッチのある遺伝子型のサンプルで、QProbe の T_m がアニーリング温度より低い場合は、産物が増幅しても蛍光の消光がみられないことがあります。

3. 反応試薬の調製

サンプルの遺伝子多型を確実にタイピングするために、1 検体につき 2 反応おこなうことをお勧めします。また、反応系にコンタミネーションがないことを確認するため、鋳型 DNA サンプルの代わりに滅菌水を加えた negative control 反応を同時に行ってください。さらに、positive control を用いた反応をあわせて行うことで、PCR 反応および検出が正常に行われていることの確認を行えます。

- (1) 予め、鋳型 DNA サンプル以外の反応試薬のプレミックスを、氷上で必要反応本数分調製します。
- (2) 反応試薬プレミックスは、必要反応数分よりも多めに調製することをお勧めします。

プライマー濃度: 0.1~0.6 μ M

QProbe と相補的な(QProbe がハイブリする)鎖を生成する側のプライマー濃度を、もう一方のプライマーの 3 倍程度(例: 0.15 μ M と 0.5 μ M)にすると、良好な場合が多いです。

QProbe 濃度: 0.2~0.4 μ M

ヘテロ型のサンプルにおいて、左右のピークの大きさがほぼ等しくなるように、濃度を調整します。

ピークの大きさのバランスは、増幅産物量とプローブ量のバランスによります。

高温側ピークの方が大きい場合は、増幅産物量に対してプローブ量が不足しているため、プローブを増やすかプライマー量を減らします。逆に低温側ピークの方が大きい場合は、プローブ量を減らすかプライマー量を増やします。

4. 反応プレート(チューブ)への分注

- (1) 使用する反応プレート(チューブ)に、反応試薬プレミックスを分注します。
- (2) 反応液中に鋳型 DNA サンプルを添加します。negative control は、鋳型 DNA サンプルの代わりに滅菌水を添加します。
- (3) 蓋をし、遠心機を利用して反応液を容器の底に落とします。
- (4) 調整後はできるだけ早く反応を開始してください。反応開始まで時間があく場合には、アルミホイルなどで遮光して氷上または冷蔵庫においてください。

5. PCR 増幅および解離曲線解析

反応プレート(チューブ)をリアルタイム PCR 装置にセットし、反応を開始します。

6. 判定

反応が終了後、解離曲線解析結果を表示し、ピークの温度から遺伝子多型を判定します。

お問い合わせ先

日鉄住金環境株式会社 J-Bio21 センター
〒305-0045 茨城県つくば市梅園 2-1-13 筑波コウケンビル 3F
TEL: 029-856-7527 FAX: 029-856-7526
E-mail: jlb-info@nske.co.jp



日鉄住金環境株式会社